

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-099532

(43)Date of publication of application : 02.04.2004

(51)Int.Cl.

C07H 21/04

(21)Application number : 2002-264099 (71)Applicant : SIGMA GENOSYS JAPAN KK

(22)Date of filing : 10.09.2002 (72)Inventor : SEKINE MITSUO
OKUBO AKIHIRO
KIYOO KOJI

(54) METHOD FOR SYNTHESIZING OLIGONUCLEOTIDE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for synthesizing an oligonucleotide in high yield without requiring protection of a base part in a phosphoramidite method.

SOLUTION: The method for synthesizing the oligonucleotide uses 1-hydroxybenzotriazole as a reaction promoter in the synthesis of the oligonucleotide by the phosphoramidite method.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 30.03.2005

[Date of sending the examiner's decision
of rejection]

[Kind of final disposal of application other
than the examiner's decision of rejection
or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's

decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect
the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]

The synthesis method of the oligonucleotide characterized by using 1-hydroxy
benzotriazol as a reaction accelerator in composition of the oligonucleotide by the
phosphoro friend DAIDO method.

[Claim 2]

The synthesis method according to claim 1 which does not protect the base of a
nucleoside and/or a nucleotide.

[Claim 3]

The synthesis method according to claim 1 or 2 whose oligonucleotide is DNA.

[Claim 4]

The oligonucleotide composition reaction accelerator which consists of 1-hydroxy
benzotriazol.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.*** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The technical field to which invention belongs]

This invention relates to the reaction accelerator used for the synthesis method of an oligonucleotide, and this. Furthermore, it is related with the reaction accelerator used for the approach and this which compound an oligonucleotide with high yield in detail, without protecting the base section.

[0002]

[Description of the Prior Art]

as the synthesis method of oligonucleotides, such as DNA, — current phosphoro friend DAIDO — law is used well. this phosphoro friend DAIDO — although law performs the reaction which adds the nucleotide one by one using the phosphorous acid amide of a nucleotide, it needs to protect the base part of each nucleotide used for a reaction using a suitable protective group.

However, by removing these protective groups after protection and the reaction of these bases, actuation becomes complicated and causes a yield fall.

[0003]

As a reaction which does not need protection of a base, the approach (nonpatent literature 1 reference) of using chlorination pyridinium as an accelerator, and the approach using imidazolinium triflate (IMT) are learned (nonpatent literature 2 reference).

However, by this approach, N-phosphorylation occurred as side reaction and there was a problem that the process which decomposes this was required.

[0004]

[Nonpatent literature 1]

GURIAZUNOFU (Gryaznov, S.M.) and RECHINGA (Letsinger, R.L.) work, "a journal OBU American chemical society (J. Am.Chem.Soc) (U.S.), 1991, 113 volumes, p.5876-5877

[Nonpatent literature 2]

Hayakawa (Hayakawa, Y) and the Kataoka (Kataoka, M) work, "a journal OBU American chemical society (J. Am.Chem.Soc) (U.S.), 1998, 120 volumes, p.12395-12401

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

This invention makes it a technical problem to offer the synthetic approach of an oligonucleotide with high yield which does not need protection of a base part.

[0006]

[Means for Solving the Problem]

this invention persons came to complete a header and this invention for the above-mentioned technical problem being solvable by using a specific reaction accelerator, as a result of inquiring wholeheartedly that the above-mentioned technical problem should be solved.

namely, this invention -- phosphoro friend DAIDO -- in composition of the oligonucleotide by law, it is related with the synthesis method of the oligonucleotide characterized by using 1-hydroxy benzotriazol as a reaction accelerator.

Moreover, this invention relates to the above-mentioned synthesis method which does not protect the base of a nucleoside and/or a nucleotide.

Moreover, this invention relates to the oligonucleotide composition reaction accelerator which consists of 1-hydroxy benzotriazol.

[0007]

[Embodiment of the Invention]

Coupling is carried out and 3' of the 2nd agent is made to connect with 5' of the 1st agent by the phosphodiester bond in the system of reaction of the liquid phase or solid phase in the approach of this invention by making the nucleoside of the 1st agent, the nucleoside of the 2nd agent (expanding agent), and/or a nucleotide react under existence of 1-hydroxy benzotriazol. Next, after removing the protective group like 5' of the nucleoside of the 2nd agent, coupling of the following nucleoside is carried out according to the same process as ****. Thus, sequential expanding of the oligonucleotide chain can be carried out.

[0008]

If a nucleoside frame is used and carried out to this invention, although there is especially no limit For example, an adenosine, a guanosine, a cytidine, a uridine, inosine, Ribonucleosides, such as xanthosine, a 2'-deoxyadenosine, 2' - deoxyguanosine, thymidine, and 2'-deoxyinosine, 2'2, such as - deoxy xanthosine, '-deoxyribonucleoside,

A 2'-O-methyl adenosine, a 2'-O-methyl guanosine and 2'-O-methyl cytidine, A 2'-O-methyl uridine, 2'-O-methyl inosine and 2'-O-methyl xanthosine, A 2'-O-methoxy ethyl adenosine and 2'-O-methoxy ethyl guanosine, A 2'-O-methoxy ethyl cytidine, 2'-O-methoxy ethyl uridine and 2'-O-methoxy ethyl inosine, 2',2', such as -O-methoxy ethyl xanthosine, -O-methoxy alkyl ribonucleoside, etc. can be mentioned. Deoxyribonucleoside is mentioned as a desirable nucleoside frame. That is, this invention can be preferably used as a synthesis method of DNA.

[0009]

These nucleoside frames are united with the purpose of a reaction, at least in 3', suitably, it is protected or activated and at least 5' is used.

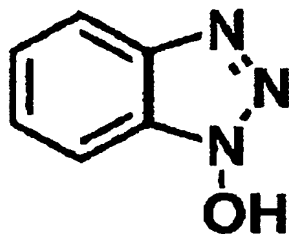
That is, when using as the 1st agent in a liquid phase reaction, for example, when turning O-tert-butyldimethylsilyl (OtBDMS) and using at least 3' as the 1st agent in solid phase reaction, it carries out combining at least 3' with O-solid support etc. moreover, the liquid phase and solid phase -- also in which reaction, when using as the 2nd agent (expanding agent), at least 3' is formed into O-phosphoramidite -- it dimethoxytrityl(DMT) turns and at least 5' is used.

[0010]

Although it is 1-hydroxy benzotriazol (HOBt) and is the thing of the following structures, if the reaction accelerator used for this invention is range which does not bar the effectiveness of this invention, even if it has the substituent, it will not interfere.

[0011]

[Formula 1]



[0012]

The synthesis method of this invention can be used for both a liquid phase reaction and solid phase reaction.

the case where it uses for a liquid phase reaction -- the 1st agent, generally the 2nd

agent (expanding agent) is desirable 0.5–10Eq to 1Eq, 1–5Eq 1–2Eq 1.1–1.3Eq is used still more preferably more preferably, generally HOBt is desirable 0.5–5Eq, and 1–3Eq 1.5–2.8Eq 2–2.5Eq is used still more preferably more preferably. Moreover, although there will be especially no limitation as a reaction solvent if usually used, acrylonitrile etc. can be mentioned, for example. Moreover, it can consider as phospho triester by oxidizing with iodine etc. after an expanding reaction.

[0013]

the case where it uses for solid phase reaction -- the 1st agent -- 1Eq -- receiving -- the 2nd agent (expanding agent) -- general -- 0.5–30Eq -- desirable -- 2–20Eq -- more -- desirable -- 5–15 -- generally as for 8–12Eq and HOBt, 5–35Eq 10–30Eq 15–25Eq is used still more preferably more preferably preferably 0.5–40Eq still more preferably.

[0014]

Moreover, at the expanding reaction of solid phase reaction, the process of washing by oxidization by washing by coupling under washing by the detritylation by a trichloroacetic acid etc., dichloromethane, an acetonitrile, etc. and HOBt existence, an acetonitrile, etc., iodine, etc., a pyridine, etc. is performed. In order to gather reaction yield here, it is desirable multiple times and to perform the process of coupling and subsequent washing twice preferably.

[0015]

Although the approach of this invention can compound an oligonucleotide, without needing a protective group for the base section, introducing a protective group into the base section and using this approach is also included in the range of this invention.

[0016]

[Example]

Hereafter, although an example explains this invention further, these examples do not limit this invention.

[0017]

It is because <example 1> N-protecting [no]. Liquid phase composition of the d [TpA] derivative 4

As shown in drawing 1 , azeotropy was repeated by the desiccation pyridine (x3), desiccation toluene (x3), and desiccation CH₂Cl₂ (x3), mixture of the thymidine 3'-O-phosphoro friend DAIDO derivative 1 (267mg, 0.36mmol) and 3'-O (tert-butyldimethylsilyl) deoxyadenosine 2 (mg [109], 0.3mmol) was used as the anhydride, and it dissolved in desiccation CH₃CN (5mL). HOBt (97mg, 0.72mmol) was added into this mixture. It agitated for 5 minutes at the room temperature, and 1M

solution of I2 (pyridine–water, 9:1, v/v, 3mL) was added into mixture. Mixture was divided into CHCl₃ (50mL) and 20% Na₂S₃ water solution (30mL) after agitating for 2 minutes at a room temperature. Organic phases were collected, and 20% Na₂S₃ water solution (30mL) washed twice 5%, and it filtered, dried by Na₂SO₄, and was made to evaporate under reduced pressure. With the silica gel column (10g), the chromatograph of the residue was carried out by 1% pyridine content CHCl₃–MeOH (100:0–97:3, v/v) 1% pyridine content hexane–CHCl₃ (50:50–0:100, v/v) and after that, and the fractionation containing a derivative 4 was obtained.

In order to remove trace of the last of a pyridine, collect fractionation, made it evaporate under reduced pressure, it was made to boil 3 times by toluene and CH₂Cl₂ finally, respectively, and the derivative 4 was obtained (280mg, 91%). By ³¹P NMR(s) and HPLC, it checked that the by-product of N-phosphorylation was not generating. ¹H NMR(CDCl₃) delta -- 0.11 (s, 6H) and 0.90 (s, 6H) -- 1.40 (s, 3H), 2.30–2.95 (m, 6H), 3.28–3.47 (m, 2H), 3.76 (s, 6H) and 4.01– 4.30 (m, 6H) and 4.73 (d, 1H, J= 2.4Hz) -- 5.11 (s, 1H) and 6.33– 6.52 (m, 4H) and 6.80 (dd, 4H, J= 3.0Hz, J= 9.0Hz) -- 7.23– 7.33 (m, 9H) and 8.02 (d, 1H, J= 2.7Hz) -- 8.36 :³¹P NMR (d, 1H, J= 4.59Hz) delta–2.19, –1.84:carbon magnetic resonance (CDCl₃) delta–4.7, –4.5, 11.7, 11.8, 17.9, 19.1, 19.4, 19.5, 19.6, 25.7, 39.8, 39.9, 55.2, 62.0, 62.1, 62.3, 63.1, 71.5, 71.7, 77.2, 79.1, 79.4, (CDCl₃) 83.8, 83.9, 84.2, 84.4, 85.1, 86.9, 87.0, 111.4, 111.5, 113.2, 115.9, 116.2, 119.4, 119.6, 125.1, 127.0, 127.8, 128.0, 128.9, 129.9, 134.9, 139.3, 139.5, 143.8, 143.9, 148.9, 151.1, 151.3, 152.6, 155.7, 158.5, 164.5, calculated–value;1025.3994 of 164.7:MS m/z M+H, measured value; 1025.3987.

[0018]

It is because <example 2> N-protecting [no]. Liquid phase composition of the d [TpC] derivative 5

As similarly shown in drawing 1 , azeotropy was repeated by the desiccation pyridine (x3), desiccation toluene (x3), and desiccation CH₂Cl₂ (x3), mixture of the thymidine 3'-O-phosphoro friend DAIDO derivative 1 (300mg, 0.403mmol) and 3'-O (tert-butyldimethylsilyl) deoxycytidine 3 (mg [116], 0.336mmol) was used as the anhydride, and it dissolved in desiccation CH₃CN (5mL). HOBt (108mg, 0.8mmol) was added into this mixture. It agitated for 5 minutes at the room temperature, and 1M solution of I2 (pyridine–water, 9:1, v/v, 3mL) was added into mixture. Mixture was divided into CHCl₃ (50mL) and 20% Na₂S₃ water solution (30mL) after agitating for 2 minutes at a room temperature. Organic phases were collected, 20% Na₂S₃ water solution (30mL) washed twice 5%, and it dried and filtered by Na₂SO₄, and was made to evaporate under reduced pressure. With the silica gel column (10g), the

chromatograph of the residue was carried out by 1% pyridine content CHCl₃-MeOH (100:0-97:3, v/v) 1% pyridine content hexane-CHCl₃ (50:50-0:100, v/v) and after that, and the fractionation containing a derivative 5 was obtained. In order to remove trace of the last of a pyridine, collect fractionation, made it evaporate under reduced pressure, it was made to boil 3 times by toluene and CH₂Cl₂ finally, respectively, and the derivative 5 was obtained (309mg, 92%). By ³¹P NMR(s) and HPLC, it checked that the by-product of N-phosphorylation was not generating.

¹H NMR(CDCl₃) delta- 0.11 (s, 6H) and 0.86 (s, 9H) -- 1.29 (s, 3H) and 2.11- 2.71 (m, 6H) and 3.33 (d, 1H, J= 8.6Hz) -- 3.45 (d, 1H, J= 9.7Hz), 3.67 (s, 6H), 3.92 (s, 1H), 4.13-4.23 (m, 5H), 5.10-5.22 (m, 1H), 5.92 (dd, 1H, J= 7.1Hz, J= 17.6Hz) 6.15 (m, 1H), 6.36 (dd, 1H, J= 5.1Hz, J= 8.9Hz) 6.77 (d, 4H, J= 8.9Hz), 7.23- 7.33 (m, 9H) and 7.47 (s, 1H) -- 7.61 ; (dd, 1H, J= 4.3Hz, J= 7.3Hz) ³¹P NMR(s) delta-1.67, -1.58:carbon magnetic resonance (CDCl₃) delta-4.8, -4.6, 11.8, 17.9, 19.6, 19.7, 19.8, 25.7, 39.0, 41.2, 55.3, 62.5, 62.6, 63.3, 70.0, 70.4, 77.2, 79.9, 84.2, 84.4, 86.1, 94.9, (CDCl₃) 111.8, 113.2, 116.2, 116.4, 123.6, 127.1, 127.9, 128.0, 128.9, 129.9, 134.8, 134.9, 135.8, 140.3, 143.8, 149.6, 150.6, 150.7, 155.3, 158.6, 163.7, 163.8, calculated-value;1001.3882 of 165.5:MS m/z M+H, measured value; 1001.3876.

[0019]

d [ApT] by no <example 3> N-protecting, d [CpT], d [GpT], solid phase composition of TpT

Although the outline was shown in drawing 2 , each chain length's expanding reaction was performed as follows.

Detritylation: For 3% trichloroacetic acid in CH₂Cl₂, 2mL, and 1 minute

Washing: CH₂Cl₂ (1 being mL 3 times), CH₃CN (1 being mL 3 times)

Coupling: It is the phosphoramidite (20micromol) of each nucleotide in CH₃CN (200microL), and HOBt (12.5mh, 40micromol) in CH₃CN (200microL), and is for 1 minute.

Washing: CH₂CN (1 being mL 3 times)

Coupling: It is the phosphoramidite (20micromol) of each nucleotide in CH₃CN (200microL), and HOBt (12.5mh, 40micromol) in CH₃CN (200microL), and is for 1 minute.

Washing: CH₂CN (1 being mL 3 times)

Oxidization: For I₂ of 0.1M, pyridine-water (9/1, v/v), and 2 minutes

Washing: A pyridine (1 being mL 3 times), CH₂CN (1 being mL 3 times), CH₂Cl₂ (1 being mL 3 times)

By processing for 1 minute with 3% trichloroacetic acid after chain length's expanding

reaction and in CH₂Cl₂ (2mL), the DMTr radical was removed and resin was washed by CH₂Cl₂ (it is 3 times at 1mL), and CH₃CN (it is 3 times at 1mL). Oligomer was processed for 40 minutes in dark NH₃ water solution (500microL), and performed desorption from deprotection and polymer support. Polymer support was removed by filtration and washed by CH₃CN (it is 3 times at 1mL). The filtrate was evaporated and Opposition HPLC or anion-exchange HPLC refined.

The yield of d [ApT], d [CpT], d [GpT], and TpT was 92%, 94%, 90%, and 92%, respectively.

Moreover, the result depended on MS is as follows, and was mostly in agreement with calculated value.

d [ApT]; calculated value (M+H) 556.1558, measured value 556.1522

d [CpT]; calculated value (M+H) 532.1445, measured value 532.1443

d [GpT]; calculated value (M+H) 572.1507, measured value 572.1494

TpT; calculated value (M+H) 572.1441, measured value 547.1439

Moreover, as shown in c-f of drawing 3 , the by-product of N-phosphorylation derivative did not generate.

[0020]

Solid phase composition of d [ApT] using the <example of a comparison> 1 IMT, and d [CpT].

When compounded by using IMT instead of HOBt like an example 3, as shown in a of drawing 3 , and b, the deoxyadenosine and N-phosphorylation derivative of deoxycytidine generated with 11% and 8% of yield.

[0021]

Solid phase composition of a <example 4> oligonucleotide

d [AAAAAAT] (7 ****), d [CCCCCCT] (7 ****), and d [CAGTCAGTCAGT] (12 ****) were compounded like the example 3. Yield was 48%, 67%, and 36%, and was high yield as compared with the old thing, respectively.

Moreover, the result depended on MS is as follows, and was mostly in agreement with calculated value.

d [AAAAAAT]; calculated value (M-H) 2119.43, measured value 2119.12

d [CCCCCCT]; calculated value (M-H) 1975.36, measured value 1975.22

d [CAGTCAGTCAGT]; calculated value (M-H) 3643.65, measured value 3642.62

Furthermore, it turned out that an enzyme decomposes the obtained oligonucleotide, and the result of having measured each amount of nucleotides by Opposition HPLC is as follows, and it has the nucleotide at a fitness rate.

d[AAAAAAT];dA:T=6.00:0.97

d[CCCCCCT];dC:T=6.00:1.03

d[CAGTCAGTCAGT];dA:dG:dC:T=1.00:1.20:0.95:0.94

Moreover, it turned out that generation of N-phosphorylation by-product is suppressed as shown in drawing 4 .

[0022]

[Effect of the Invention]

The oligonucleotide composition with high yield was attained by this invention, without needing N-protection.

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Drawing 1 is the example of this invention in a liquid phase reaction.

[Drawing 2] Drawing 2 is the example of this invention in solid phase reaction.

[Drawing 3] Drawing 3 is an HPLC chart which shows the result of an example 3 and the example 1 of a comparison.

[Drawing 4] Drawing 4 is an HPLC chart which shows the result of an example 4.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-99532

(P2004-99532A)

(43) 公開日 平成16年4月2日(2004. 4. 2)

(51) Int. Cl.⁷
C07H 21/04F1
C07H 21/04B
テーマコード(参考)
4C057

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2002-264099(P2002-264099)
(22) 出願日 平成14年9月10日(2002. 9. 10)特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年3月1
1日 社団法人日本化学会発行の「日本化学会第81春
季年会 講演予稿集11」に発表(71) 出願人 502329522
シグマジェノシスジャパン株式会社
北海道石狩市新港西1丁目777-13

(74) 代理人 230104019

弁理士 大野 聖二

(74) 代理人 100106840

弁理士 森田 耕司

(74) 代理人 100114465

弁理士 北野 健

(72) 発明者 関根 光雄

神奈川県横浜市緑区長津田町4259 東

京工業大学大学院生命理工学研究科内

(72) 発明者 大窪 章寛

神奈川県横浜市緑区長津田町4259 東

京工業大学大学院生命理工学研究科内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチド合成法

(57) 【要約】

【課題】 塩基部分の保護を必要とせずに、ホスホロアミダイド法において収率の高いオリ
ゴヌクレオチドの合成方法を提供する。

【解決手段】 合成促進剤として、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを用いる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ホスホロアミダイド法によるオリゴヌクレオチドの合成において、反応促進剤として 1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを用いることを特徴とするオリゴヌクレオチドの合成法。

【請求項 2】

ヌクレオシドおよび／またはヌクレオチドの塩基を保護しない請求項 1 記載の合成法。

【請求項 3】

オリゴヌクレオチドが DNA である請求項 1 または 2 記載の合成法。

【請求項 4】

1-ヒドロキシベンゾトリアゾールからなるオリゴヌクレオチド合成反応促進剤。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、オリゴヌクレオチドの合成法およびこれに用いる反応促進剤に関する。更に詳しくは、塩基部を保護することなく、収率の高いオリゴヌクレオチドを合成する方法およびこれに用いる反応促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

DNA などのオリゴヌクレオチドの合成法としては、現在ホスホロアミダイド法がよく用いられている。このホスホロアミダイド法は、ヌクレオチドの亜リン酸アミドを用いて、順次ヌクレオチドを付加していく反応を行うものであるが、反応に用いる各ヌクレオチドの塩基部分を適当な保護基を用いて保護する必要がある。

20

しかし、これらの塩基の保護および、反応後にこれらの保護基をはずすことにより、操作が煩雑となり、収率低下の要因ともなる。

【0003】

塩基の保護を必要としない反応としては、塩化ビリジニウムを促進剤として用いる方法や（非特許文献 1 参照）、イミダゾリニウムトリフレート（IMT）を用いる方法が知られている（非特許文献 2 参照）。

しかし、この方法では、副反応として N-リン酸化反応が起こり、これを分解する工程が必要であるという問題があった。

30

【0004】

【非特許文献 1】

グリヤズノフ（Gryaznov, S. M.）、レチンガー（Lettinger, R. L.）著、「ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティー（J. Am. Chem. Soc.）（米国）、1991 年、113 巻、p. 5876-5877

【非特許文献 2】

早川（Hayakawa, Y）、片岡（Kataoka, M）著、「ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティー（J. Am. Chem. Soc.）（米国）、1998 年、120 巻、p. 12395-12401

40

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、塩基部分の保護を必要としない、収率の高いオリゴヌクレオチドの合成方法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、特定の反応促進剤を用いることにより上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、ホスホロアミダイド法によるオリゴヌクレオチドの合成において、反応促進剤として 1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを用いることを特徴とするオリゴヌクレオチドの合成法に関するものである。

50

また、本発明は、ヌクレオシドおよび／またはヌクレオチドの塩基を保護しない上記合成法に関するものである。

また、本発明は、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールからなるオリゴヌクレオチド合成反応促進剤に関するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の方法においては、液相または固相の反応系において、第1剤のヌクレオシドと第2剤（伸長剤）のヌクレオシドおよび／またはヌクレオチドとを1-ヒドロキシベンゾトリアゾールの存在下で反応させることによりカップリングさせて、第1剤の5'位と第2剤の3'位とをホスホジエステル結合により連結させる。次に、第2剤のヌクレオシドの5'位の保護基を除去した後に、上述と同様の工程により次のヌクレオシドをカップリングさせる。このようにして、オリゴヌクレオチド鎖を順次伸長させることができる。

【0008】

本発明に用いるヌクレオシド骨格としては、特に制限はないが、例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン、イノシン、キサントシンなどのリボヌクレオシド、2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシン、チミジン、2'-デオキシイノシン、2'-デオキシキサントシンなどの2'-デオキシリボヌクレオシド、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルグアノシン、2'-O-メチルシチジン、2'-O-メチルウリジン、2'-O-メチルイノシン、2'-O-メチルキサントシン、2'-O-メトキシエチルアデノシン、2'-O-メトキシエチルグアノシン、2'-O-メトキシエチルシチジン、2'-O-メトキシエチルウリジン、2'-O-メトキシエチルイノシン、2'-O-メトキシエチルキサントシンなどの2'-O-メトキシアルキルリボヌクレオシドなどを挙げることができる。好ましいヌクレオシド骨格としては、デオキシリボヌクレオシドが挙げられる。即ち、本発明は、好ましくは、DNAの合成法として用いることができる。

【0009】

これらのヌクレオシド骨格は、反応の目的にあわせて、5'位および3'位を適宜保護または活性化して用いられる。

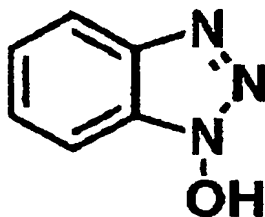
即ち、液相反応において第1剤として用いる場合は、例えば、3'位をO-tert-ブチルジメチルシリル（OtBDMS）化し、固相反応において第1剤として用いる場合は、例えば、3'位をO-固体担体に結合するなどする。また、液相、固相いずれの反応においても、第2剤（伸長剤）として用いる場合は、例えば、3'位をO-ホスホルアミダイド化し、5'位をジメトキシトリチル（DMTr）化して用いる。

【0010】

本発明に用いられる反応促進剤は、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）であり、以下の構造のものであるが、本発明の効果を妨げない範囲であれば、置換基を有していても差し支えない。

【0011】

【化1】



【0012】

本発明の合成法は、液相反応、固相反応のいずれにも用いることができる。

液相反応に用いる場合は、第1剤1当量に対して、第2剤（伸長剤）は一般的に0.5～10当量、好ましくは1～5当量、より好ましくは1～2当量、さらに好ましくは1.1～1.3当量が用いられ、HOBtは一般的に0.5～5当量、好ましくは1～3当量、より好ましくは1.5～2.8当量、さらに好ましくは2～2.5当量が用いられる。また、反応溶媒としては、通常用いられるものであれば、特に限定はないが、例えばアクリロニトリルなどを挙げることができる。また、伸長反応の後、ヨウ素等で酸化することにより、ホスホトリエステルとすることができる。

【0013】

固相反応に用いる場合は、第1剤1当量に対して、第2剤（伸長剤）は一般的に0.5～30当量、好ましくは2～20当量、より好ましくは5～15、さらに好ましくは8～12当量、HOBtは一般的に0.5～40当量、好ましくは5～35当量、より好ましくは10～30当量、さらに好ましくは15～25当量が用いられる。

10

【0014】

また、固相反応の伸長反応では、トリクロロ酢酸等による脱トリチル化、ジクロロメタン、アセトニトリル等による洗浄、HOBt存在下でのカップリング、アセトニトリル等による洗浄、ヨウ素等による酸化、ピリジン等による洗浄の工程を行う。ここで反応収率をあげるために、カップリングとその後の洗浄の工程を複数回、好ましくは2回行うことが望ましい。

【0015】

本発明の方法は、塩基部に保護基を必要とせずにオリゴヌクレオチドを合成できるものであるが、塩基部に保護基を導入して本方法を用いることも、本発明の範囲に含まれるものである。

20

【0016】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに説明するが、これらの実施例は、本発明を限定するものではない。

【0017】

<実施例1> N-無保護による d [TpA] 誘導体4の液相合成

図1に示すように、チミジン3'-O-ホスホロアミダイド誘導体1（267mg、0.36mmol）および3'-O（tert-ブチルジメチルシリル）デオキシアデノシン2（109mg、0.36mmol）の混合物を乾燥ピリジン（x3）、乾燥トルエン（x3）、乾燥CH₂Cl₂（x3）により共沸を繰り返して無水物とし、乾燥CH₃CN（5mL）に溶解した。この混合物にHOBt（97mg、0.72mmol）を添加した。室温で5分間攪拌し、I₂（ピリジン-水、9：1、v/v、3mL）の1M溶液を混合物に添加した。室温で2分間攪拌した後、混合物をCHCl₃（50mL）と5%Na₂S₂O₃水溶液（30mL）に分けた。有機相を集めて、5%Na₂S₂O₃水溶液（30mL）で2回洗浄してろ過し、Na₂SO₄で乾燥し、減圧下で蒸発させた。残渣をシリカゲルカラム（10g）で、1%ピリジン含有ヘキサン-CHCl₃（50：50-0：100、v/v）、その後1%ピリジン含有CHCl₃-MeOH（100：0-97：3、v/v）でクロマトグラフし、誘導体4を含む分画を得た。

30

40

ピリジンの最後のトレースを取り除くため、分画を集め、減圧下で蒸発させ、最後にトルエンおよびCH₂Cl₂でそれぞれ3回共沸させ、誘導体4を得た（280mg、91%）。³¹P NMRおよびHPLCにより、N-リン酸化の副生成物が生成していないことを確認した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 0.11 (s, 6H), 0.90 (s, 6H), 1.40 (s, 3H), 2.30-2.95 (m, 6H), 3.28-3.47 (m, 2H), 3.76 (s, 6H), 4.01-4.30 (m, 6H), 4.73 (d, 1H, J=2.4Hz), 5.11 (s, 1H), 6.33-6.52 (m, 4H), 6.80 (dd, 4H, J=3.0Hz, J=9.0Hz), 7.23-7.33 (m, 9H), 8.02 (d, 1H, J=2.7Hz), 8.36 (d, 1H, J=4.59Hz) : ³¹P NMR

50

R (C D C l₃) δ -2. 19、-1. 84 : ¹ ³ C NMR (C D C l₃) δ -4. 7、
-4. 5、11. 7、11. 8、17. 9、19. 1、19. 4、19. 5、19. 6、
25. 7、39. 8、39. 9、55. 2、62. 0、62. 1、62. 3、63. 1、
71. 5、71. 7、77. 2、79. 1、79. 4、83. 8、83. 9、84. 2、
84. 4、85. 1、86. 9、87. 0、111. 4、111. 5、113. 2、11
5. 9、116. 2、119. 4、119. 6、125. 1、127. 0、127. 8、
128. 0、128. 9、129. 9、134. 9、139. 3、139. 5、143.
8、143. 9、148. 9、151. 1、151. 3、152. 6、155. 7、15
8. 5、164. 5、164. 7 : MS m/z M+Hの計算値 ; 1025. 3994
、測定値 ; 1025. 3987。

10

【0018】

<実施例2> N-無保護による d [T p C] 誘導体5の液相合成
同じく図1に示すように、チミジン3'-O-ホスホロアミダイド誘導体1 (300 mg
、0. 403 mmol) および3'-O (t e r t -ブチルジメチルシリル) デオキシシ
チジン3 (116 mg、0. 336 mmol) の混合物を乾燥ピリジン (x 3)、乾燥ト
ルエン (x 3)、乾燥CH₂ Cl₂ (x 3) により共沸を繰り返して無水物とし、乾燥C
H₃ CN (5 mL) に溶解した。この混合物にHOBt (108 mg、0. 8 mmol)
を添加した。室温で5分間攪拌し、I₂ (ピリジン-水、9 : 1、v/v、3 mL) の1
M溶液を混合物に添加した。室温で2分間攪拌した後、混合物をCHCl₃ (50 mL)
と5% Na₂ S₂ O₃ 水溶液 (30 mL) に分けた。有機相を集めて、5% Na₂ S₂ O₃
水溶液 (30 mL) で2回洗浄し、Na₂ S O₄ で乾燥してろ過し、減圧下で蒸発させ
た。残渣をシリカゲルカラム (10 g) で、1%ピリジン含有ヘキサン-CHCl₃ (5
0 : 50-0 : 100, v/v)、その後1%ピリジン含有CHCl₃-MeOH (10
0 : 0-97 : 3, v/v) でクロマトグラフし、誘導体5を含む分画を得た。ピリジ
ンの最後のトレースを取り除くため、分画を集め、減圧下で蒸発させ、最後にトルエンおよ
びCH₂ Cl₂ でそれぞれ3回共沸させ、誘導体5を得た (309 mg、92%)。 ³ ¹
P NMRおよびHPLCにより、N-リン酸化の副生成物が生成していないことを確認し
た。

20

¹ H NMR (C D C l₃) δ -0. 11 (s、6 H)、0. 86 (s、9 H)、1. 2
9 (s、3 H)、2. 11-2. 71 (m、6 H)、3. 33 (d、1 H、J=8. 6 H
z)、3. 45 (d、1 H、J=9. 7 H z)、3. 67 (s、6 H)、3. 92 (s、
1 H)、4. 13-4. 23 (m、5 H)、5. 10-5. 22 (m、1 H)、5. 92
(dd、1 H、J=7. 1 H z、J=17. 6 H z)、6. 15 (m、1 H)、6. 36
(dd、1 H、J=5. 1 H z、J=8. 9 H z)、6. 77 (d、4 H、J=8. 9 H
z)、7. 23-7. 33 (m、9 H)、7. 47 (s、1 H)、7. 61 (dd、1 H
、J=4. 3 H z、J=7. 3 H z) ; ³ ¹ P NMR (C D C l₃) δ -1. 67、-1
. 58 : ¹ ³ C NMR (C D C l₃) δ -4. 8、-4. 6、11. 8、17. 9、19
. 6、19. 7、19. 8、25. 7、39. 0、41. 2、55. 3、62. 5、62
. 6、63. 3、70. 0、70. 4、77. 2、79. 9、84. 2、84. 4、86
. 1、94. 9、111. 8、113. 2、116. 2、116. 4、123. 6、12
7. 1、127. 9、128. 0、128. 9、129. 9、134. 8、134. 9、
135. 8、140. 3、143. 8、149. 6、150. 6、150. 7、155.
3、158. 6、163. 7、163. 8、165. 5 : MS m/z M+Hの計算値
 ; 1001. 3882、測定値 ; 1001. 3876。

30

40

【0019】

<実施例3> N-無保護による d [A p T]、d [C p T]、d [G p T]、T p Tの固
相合成

図2に概略を示すが、おのおのの鎖長の伸長反応は、次のように行った。

脱トリチル化 : CH₂ Cl₂ 中の3%トリクロロ酢酸、2 mL、1分間

洗浄 : CH₂ Cl₂ (1 mLで3回)、CH₃ CN (1 mLで3回)

50

カップリング： CH_3CN ($200\ \mu\text{L}$) 中の各ヌクレオチドのホスホルアミダイド ($20\ \mu\text{mol}$)、 CH_3CN ($200\ \mu\text{L}$) 中の HOBt ($12.5\ \text{mh}$ 、 $40\ \mu\text{mol}$) で 1 分間

洗浄： CH_2CN ($1\ \text{mL}$ で 3 回)

カップリング： CH_3CN ($200\ \mu\text{L}$) 中の各ヌクレオチドのホスホルアミダイド ($20\ \mu\text{mol}$)、 CH_3CN ($200\ \mu\text{L}$) 中の HOBt ($12.5\ \text{mh}$ 、 $40\ \mu\text{mol}$) で 1 分間

洗浄： CH_2CN ($1\ \text{mL}$ で 3 回)

酸化： $0.1\ \text{M}$ の I_2 、ピリジン-水 ($9/1$, v/v)、2 分間

洗浄：ピリジン ($1\ \text{mL}$ で 3 回)、 CH_2CN ($1\ \text{mL}$ で 3 回)、 CH_2Cl_2 ($1\ \text{mL}$ で 3 回) 10

鎖長の伸長反応の後、 CH_2Cl_2 ($2\ \text{mL}$) 中の 3% トリクロロ酢酸で 1 分間処理することにより、 DMTr 基を除去し、樹脂を CH_2Cl_2 ($1\ \text{mL}$ で 3 回)、 CH_3CN ($1\ \text{mL}$ で 3 回) で洗浄した。オリゴマーは、濃 NH_3 水溶液 ($500\ \mu\text{L}$) で 40 分間処理し、脱保護とポリマー担体からの脱離を行った。ポリマー担体はろ過により取り除き、 CH_3CN ($1\ \text{mL}$ で 3 回) で洗浄した。ろ液を蒸発させ、逆相 HPLC または陰イオン交換 HPLC により精製した。

$d[\text{ApT}]$, $d[\text{CpT}]$, $d[\text{GpT}]$, TpT の収率は、それぞれ、92%、94%、90%、92% であった。

また、MS による結果は、以下の通りであり、計算値とほぼ一致した。 20

$d[\text{ApT}]$; 計算値 ($\text{M}+\text{H}$) 556.1558、測定値 556.1522

$d[\text{CpT}]$; 計算値 ($\text{M}+\text{H}$) 532.1445、測定値 532.1443

$d[\text{GpT}]$; 計算値 ($\text{M}+\text{H}$) 572.1507、測定値 572.1494

TpT ; 計算値 ($\text{M}+\text{H}$) 572.1441、測定値 547.1439

また、図 3 の c ~ f に示すように、N-リン酸化誘導体の副生成物は生成しなかった。

【0020】

<比較例 1> IMT を用いた $d[\text{ApT}]$ および $d[\text{CpT}]$ の固相合成。

実施例 3 と同様に HOBt のかわりに IMT を用いて合成を行ったところ、図 3 の a, b に示すように、デオキシアデノシンおよびデオキシシチジンの N-リン酸化誘導体が 11% および 8% の収率で生成した。 30

【0021】

<実施例 4> オリゴヌクレオチドの固相合成

実施例 3 と同様にして、 $d[\text{AAAAAAT}]$ (7 量体)、 $d[\text{CCCCCCT}]$ (7 量体)、 $d[\text{CAGTCAGTCAGT}]$ (12 量体) を合成した。収率は、それぞれ、48%、67%、36% であり、これまでのものに比較して高い収率であった。

また、MS による結果は、以下の通りであり、計算値とほぼ一致した。

$d[\text{AAAAAAT}]$; 計算値 ($\text{M}-\text{H}$) 2119.43、測定値 2119.12

$d[\text{CCCCCCT}]$; 計算値 ($\text{M}-\text{H}$) 1975.36、測定値 1975.22

$d[\text{CAGTCAGTCAGT}]$; 計算値 ($\text{M}-\text{H}$) 3643.65、測定値 3642.62 40

さらに、得られたオリゴヌクレオチドを酵素により分解し、逆相 HPLC により各ヌクレオチド量を測定した結果は以下の通りであり、適性割合でヌクレオチドを有していることがわかった。

$d[\text{AAAAAAT}]$; $d\text{A} : \text{T} = 6.00 : 0.97$

$d[\text{CCCCCCT}]$; $d\text{C} : \text{T} = 6.00 : 1.03$

$d[\text{CAGTCAGTCAGT}]$; $d\text{A} : d\text{G} : d\text{C} : \text{T} = 1.00 : 1.20 : 0.95 : 0.94$

また、図 4 に示すように N-リン酸化副生成物の生成が抑えられていることがわかった。

【0022】

【発明の効果】 50

本発明により、N-保護を必要とせずに、収率の高いオリゴヌクレオチド合成が可能となった。

【図面の簡単な説明】

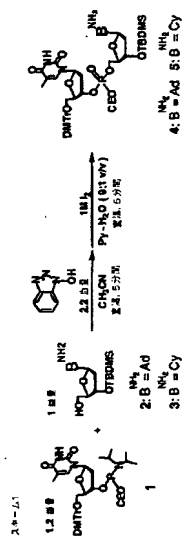
【図 1】 図 1 は、液相反応における本発明の例である。

【図 2】 図 2 は、固相反応における本発明の例である。

【図 3】 図 3 は、実施例 3、比較例 1 の結果を示す H P L C チャートである。

【図 4】 図 4 は、実施例 4 の結果を示す H P L C チャートである。

【図 1】



【図 3】

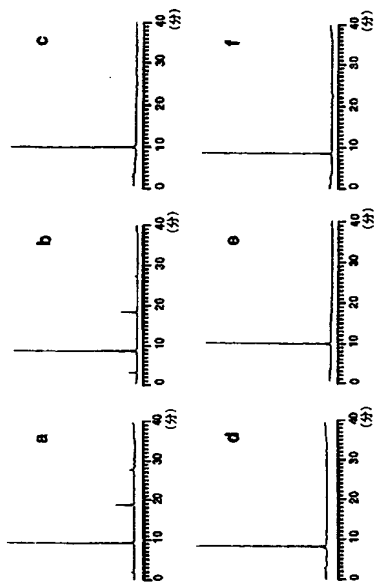


図3は、図1の化合物を用いたHPLCのクロマトグラムを示す。図3(a)は、d(ApT)を用いたHPLCのクロマトグラムを示す。図3(b)は、d(CpT)を用いたHPLCのクロマトグラムを示す。図3(c)は、d(ApT)を用いたHPLCのクロマトグラムを示す。図3(d)は、d(CpT)を用いたHPLCのクロマトグラムを示す。図3(e)は、d(CpT)を用いたHPLCのクロマトグラムを示す。図3(f)は、d(CpT)を用いたHPLCのクロマトグラムを示す。

【図 4】

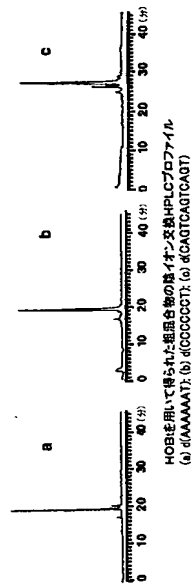


図4は、図1の化合物を用いたHPLCのクロマトグラムを示す。図4(a)は、d(ApT)を用いたHPLCのクロマトグラムを示す。図4(b)は、d(CpT)を用いたHPLCのクロマトグラムを示す。図4(c)は、d(CpT)を用いたHPLCのクロマトグラムを示す。

BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(72)発明者 清尾 康志

神奈川県横浜市緑区長津田町 4 2 5 9 東京工業大学大学院生命理工学研究科内

F ターム(参考) 4C057 AA19 BB02 DD01 MM04